

## CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE MUTANTES DE LEVEDURA *mca1Δ* E *rim 13Δ* COM ATIVIDADE DE CISTEÍNA PROTEASE

Julia Parada Costa Silva <sup>1</sup>; Fabienne Micheli <sup>2</sup>; Martin Brendel <sup>3</sup>; Cristina Pungartnik <sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Discente do Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado do DCB/UESC, Bolsista de Iniciação Científica da FAPESB, E-mail: j.parada@uol.com.br; <sup>2</sup>Pesquisadora Visitante CIRAD/frança, E-mail: fabienne.micheli@cirad.fr; <sup>3</sup>Pesquisador Visitante FAPESB, E-mail: martinbrendel@yahoo.com.br; <sup>4</sup>Profa. Adjunta Biofísica e Biologia Celular /UESC, E-mail: cpungartnik@yahoo.com.br.

### INTRODUÇÃO

Por volta de 1989, a cacauicultura na região sul da Bahia começou a declinar devido à vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer. Estudos moleculares demonstram a presença de genes expressos de diferentes classes de proteases em bibliotecas de cDNA das interações de *T. cacao*-*C. pernicios* (GESTEIRA et al., em preparação). Dentre as classes de proteases existentes, as cisteínas proteases (CisPr) apresentam enzimas que se destacam entre as CisPr do tipo caspase e as CisPr do tipo papaína. A participação de caspases em processo de morte celular programada (PCD, Programmed Cell Death) foi observada em plantas infectadas por patógenos (HOEBERICHTS et al., 2003; CHICHKOVA et al., 2004), enquanto papaínas de plantas foram descritas como associadas à defesa contra patógenos (SOLOMON et al., 1999; AVROVA et al., 1999). Por apresentar organização unicelular, crescimento rápido em diversas escalas, genoma relativamente pequeno e totalmente seqüenciado, apresentando genes que conservam um grau de homologia bastante alto com outros organismos, podendo alguns deles complementar funções com genes de outros organismos, a levedura *S. cerevisiae* é o microorganismo mais aplicável em estudos que buscam o entendimento das funções celulares de diferentes genes (VIAU, 2005). Desta forma, a fim de se verificar a função de uma CisPr do tipo papaína de cacau (TcCisPr), foram selecionados dois mutantes de levedura defectivos, respectivamente, no gene RIM13 (CisPr do tipo papaína) e no gene MCA1 (suposta CisPr do tipo caspase), para possível complementação funcional via expressão heteróloga do gene da TcCisPr. Para tal, inicialmente, os mutantes devem ser caracterizados fenotipicamente em relação ao selvagem para que possa ser atestada ou não a complementação funcional após clonagem do gene.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foi feita análise da sensibilidade de linhagens mutantes *mca1Δ* e *rim13Δ* derivadas da selvagem BY10000 quando submetidas, separadamente, aos seguintes tratamentos:

- 1) exposição crônica de células em fase estacionária de crescimento (EST, 2 dias crescendo em meio líquido,  $2 \times 10^8$  cél/mL) a paraquat [0.5, 1 e 1.5mM] e a  $H_2O_2$  [3.8, 4, 4.2 e 4.4mM];
- 2) exposição de células em fase EST e em fase LOG (crescimento 4,5h em meio líquido, > ou = 30% brotos,  $2 \times 10^7$  cél/mL) a diferentes temperaturas - [16°C, 25°C, 30°C e 37°C] em meio Y e [16°C e 30°C] em meio SC;
- 3) exposição crônica de células em fase EST e em fase exponencial de crescimento (LOG) a: a) NaCl [0.25, 0.5 e 1M] com variação de temperatura [16°C, 25°C, 30°C], b) NaCl [1, 1.5 e 2M] em meio completo (Y) e em meio seletivo completo (SC), e c) em meios Y e SC sob diferentes condições de pH [7.4 e 8] e com variação de temperatura [16°C, 25°C, 30°C e 37°C];
- 4) exposição aguda (de 0 a 60 minutos) de células em fase EST aos agentes  $SnCl_2$  [25 mM] e NaCl [1M], e de células em fase LOG a  $SnCl_2$  [25μM];
- 5) exposição de células em fase EST a UVC [40, 60 e 80J/m<sup>2</sup>] e de células em fase LOG a

UVC [60, 80 e 100J/m<sup>2</sup>];

6) crescimento em meio líquido com glicerol por dois dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Entre os resultados obtidos, alguns demonstraram certa divergência fenotípica entre linhagens mutante e selvagem, os quais indicaram: a) as linhagens mutantes foram mais sensíveis que a selvagem quando submetidas ao meio líquido com glicerol e quando expostas a 16°C em meio Y pH 7.4 (células em fases EST e LOG) e a 25°C em meio Y pH 8.0 (células em fases EST e LOG) e pH 7.4 (células em fase LOG), sendo mais evidente em *rim13Δ*; b) apenas *rim13Δ* apresentou-se mais sensível que a selvagem quando expostas a 30 e 37°C em meio Y pH 8.0 e a 16°C em meio Y e SC (células em fase LOG); c) *mca1Δ* demonstrou menor sensibilidade que as demais linhagens ao serem expostas a NaCl [1.5M] em meio Y (células em fases EST e LOG), a NaCl [0.25, 0.5 e 1M] em 16°C e a NaCl [1M] em 25°C (células em fases EST); d) *mca1Δ* apresentou resistência ao tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os demais resultados não foram significativos, ou seja, não representaram um fenótipo divergente, logo não serão válidos para uma futura análise de complementação funcional.

## CONCLUSÕES

A partir dos tratamentos analisados foi possível caracterizar e diferenciar fenotipicamente as linhagens mutantes da linhagem selvagem permitindo que, futuramente, possa ser atestada ou não a complementação funcional dos mutantes pelo gene da TcCisPr via expressão heteróloga. Assim, o fenótipo escolhido para complementação funcional no mutante *mca1Δ* seria a hiperresistência ao peróxido de hidrogênio em fase EST e para o mutante *rim13Δ* seria o crescimento em meio contendo glicerol em fase EST.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVROVA, A.O.; STEWART, H.E.; DE JONG, W.; HEILBRONN, J.; LYON, G.D. & BIRCH, P.R.J. A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 12(12): 1114-1119. 1999.

CHICHKOVA, N.V.; KIM, S.H.; TITOVA, E.S.; KALKUM, M.; MOROZOV, V.S.; RUBTSOV, Y.P.; KALININA, N.O.; TALIANSKY, M.E. & VARTAPETIAN, A.B. A plant caspase-like protease activated during the Hypersensitive Response. **The Plant Cell**, 16: 157-171. 2004.

HOEBERICHTS, F.A.; HAVE, A.T. & WOLTERING, E.J. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. **Planta**, 217: 517-522. 2003.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E. & LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and proteinase inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, 11: 431-443. 1999.

VIAU, C. M. **Efeitos Tóxicos e Genotóxicos do Cloreto de Estanho (SnCl<sub>2</sub>) em Bactéria e Levedura**. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (obtenção do título de Mestre em Ciências); Porto Alegre-RS, 2005.

**PALAVRAS-CHAVE:** vassoura-de-bruxa; cisteína protease; complementação funcional

**AGÊNCIAS FINANCIADORAS:** CNPq e FAPESB